N° d'enregistrement
au C.N.R.S.
AO 2783

ARTICLE PRINCIPAL

Recouvrant en partie

LA THESE DE DOCTORAT ES-SCIENCES PHYSIQUES

présentée

A LA FACULTE DES SCIENCES DE PARIS

par

Anne-Christine DIANOUX

pour obtenir

le grade de Docteur Es-Sciences

Sujet de la Thèse: Contribution à l'étude comparée des lysozymes: LE LYSOZYME DE BLANC D'OEUF D'OIE

soutenue le 3 juillet 1969 devant la Commission d'Examen:

MM.	DERVICHIAN	Président
	CHAPEVILLE	Examinateurs
	JOLLES	

UNIV.
LEIDEN.
BIBL.

BBA 35051

ÉTUDE D'UN LYSOZYME PAUVRE EN CYSTINE ET EN TRYPTOPHANE: LE LYSOZYME DE BLANC D'OEUF D'OIE*

ANNE-CHRISTINE DIANOUX ET PIERRE JOLLÈS
Laboratoire de Chimie Biologique, Faculté des Sciences, Paris (France)
(Reçu le 3 octobre, 1966)

Reprinted from
Biochimica et Biophysica Acta
Elsevier Publishing Company
Amsterdam
Printed in The Netherlands

BBA 35051

ÉTUDE D'UN LYSOZYME PAUVRE EN CYSTINE ET EN TRYPTOPHANE: LE LYSOZYME DE BLANC D'OEUF D'OIE*

ANNE-CHRISTINE DIANOUX ET PIERRE JOLLÈS
Laboratoire de Chimie Biologique, Faculté des Sciences, Paris (France)

(Reçu le 3 octobre, 1966)

SUMMARY

Study of a lysozyme with a low cystine and tryptophan content: The goose egg-white lysozyme

Goose egg-white lysozyme (EC 3.2.1.17) was obtained in a chromatographically pure state; its amino acid composition was established and the terminal amino acids were determined. This new lysozyme, differing from other bird egg-white lysozymes already studied, is particularly poor in cystine and tryptophan. It is very labile, even at acidic pH; its specific activity is, however, higher than that of hen egg-white lysozyme and it can be digested by trypsin in its native state. It represents an interesting example in the study of the relationship between the structure and activity of lysozymes.

INTRODUCTION

Dans le cadre de l'étude comparée de lysozymes (EC 3.2.1.17) d'origines diverses entreprise par JOLLÈS et coll.[1,2] (notamment: lysozymes d'origine humaine, lysozymes de blancs d'oeufs d'oiseaux, lysozymes d'invertébrés), l'étude du lysozyme de blanc d'oeuf d'oie vient d'être commencée[8].

De précédentes recherches se rapportant à d'autres lysozymes d'oiseaux, à savoir aux lysozymes de blanc d'oeuf de cane[3] avaient permis d'établir qu'il s'agissait là d'enzymes ayant les 6 propriétés habituelles des lysozymes: (1) caractère basique; (2) faible poids moléculaire; (3) stabilité en milieu acide, même à 100° pendant un temps court; (4) labilité en milieu alcalin; (5) lyse d'un nombre restreint de bactéries (*Micrococcus lysodeikticus*); (6) scission de liaisons β (1→4) entre des résidus d'acide *N*-acétylmuramique et de *N*-acétylglucosamine ou entre 2 résidus de *N*-acétylglucosamine. Par contre, ces lysozymes de cane avaient des comportements chromatographiques[3], des compositions en acides aminés[3] et des structures différents (J. JOLLÈS, J. HERMANN, B. NIEMANN ET P. JOLLÈS, expériences inédites) de ceux du lysozyme de poule.

Dès le début de nos travaux sur le lysozyme de blanc d'oeuf d'oie[8], il a été constaté que ce nouvel enzyme lysant est très labile, même en milieu acide et de ce fait ne possède pas la troisième propriété des lysozymes énoncée ci-dessus. Dans ce

* 51ème communication sur les lysozymes; 50ème communication, voir réf. 8.

mémoire consacré au lysozyme d'oie, nous allons décrire sa purification, sa composition en acides aminés et ses acides terminaux: ces données nous permettront d'apporter une explication à sa labilité.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Lysozymes

Les oeufs d'oie (oeufs d'oies des Landes) ont été fournis par le Centre National de Recherches Zootechniques, Domaine expérimental d'Artiguères par Benquet (Landes). Le lysozyme de blanc d'oeuf de poule provenait de la maison Armour, Kankakee, Ill., U.S.A. (lot 638040).

Détermination de l'activité lysante

L'augmentation de la transmission d'une suspension de *M. lysodeikticus* sous l'action d'un lysozyme est déterminée comme indiqué par JOLLÈS et coll.[2]. Les quantités de lysozyme ainsi dosées sont exprimées en lysozyme de blanc d'oeuf de poule.

Teneur en protéine

La teneur en protéine a été déterminée par spectrométrie ultraviolette à 280 mμ ou par un dosage à la ninhydrine après hydrolyse alcaline.

Électrophorèse sur bandes de 'Cello-gel'

Ces électrophorèses ont été effectuées avec une solution tampon d'acétate de sodium (pH 4.5), 0.05 M pendant 1.5 h sous 110 V et à 20°. Les bandes ont été colorées avec l'amido-schwarz.

Composition quantitative en acides aminés

Elle a été déterminée après hydrolyse acide totale (HCl, 6 M; 110°; 14, 18, 24, 40 h; tube scellé sous vide) avec un Autoanalyseur Technicon. La cystine a été dosée sous forme d'acide cystéique après oxydation par l'acide performique.

Détermination du tryptophane

La caractérisation et le dosage du tryptophane ont présenté de grandes difficultés et ont été effectués par divers procédés: (a) par chromatographie sur papier et détection avec le réactif d'Ehrlich; (b) par la méthode de SPIES ET CHAMBERS[4] sur le lysozyme natif et après hydrolyse enzymatique (chymotrypsine et pronase); (c) par spectrométrie ultraviolette après ozonisation (augmentation de l'absorption à 315 mμ)[5]; (d) par dosage avec l'Autoanalyseur du tryptophane obtenu après hydrolyse alcaline[6]: $Ba(OH)_2$, 2 M; 64 h; 110°; (e) par dosage avec l'Autoanalyseur du tryptophane libéré par action de la carboxypeptidase (pH 7.5; 1 h, 37°, DFP) sur l'hydrolysat chymotrypsique (pH 7.8, 4 h, 37°) du lysozyme natif ou dénaturé par chauffage (1 h, 100°, l'absence de coupures a été vérifiée); (f) par chromato-électrophorèse en couche mince (cellulose MN 300) de l'hydrolysat trypsique du lysozyme réduit et révélation des peptides par le réactif d'Ehrlich.

Détermination des acides aminés N- et C-terminaux

Les acides aminés N-terminaux ont été déterminés par action d'une aminopeptidase de moisissures[7] (pH 7.8; 4, 6, 12 et 15 h; 37°) et les acides aminés C-termi-

naux par action de la carboxypeptidase (EC 3.4.2.1) (pH 7.8, 2 h, 37°, DFP). Dans les 2 cas, les acides aminés libérés ont été dosés avec un Autoanalyseur.

Hydrolyse trypsique

Le lysozyme natif a été soumis à pH 7.8 et à 37° pendant différents temps à l'action de la trypsine (EC 3.4.4.4) prétraitée (HCl 0.06 M; 37°, 18 h). Rapport enzyme/substrat: 1/50.

Stabilité à la chaleur

Le lysozyme a été chauffé à 100° pendant 0.5 ou 1 min à différents pH (solutions tampons d'acétate de sodium, de phosphate de sodium ou de Tris, 0.05 M). L'activité résiduelle est calculée par rapport à l'activité de la solution non chauffée au même pH.

Méthode chromatographique de préparation

La méthode de préparation qui avait été utilisée jusqu'à présent comportait les 4 étapes suivantes[1,2]: (1) préparation d'un extrait riche en lysozyme; (2) chromatographie sur CM-cellulose; (3) filtration sur Sephadex G-25; (4) chromatographie d'équilibre sur Amberlite CG-50. Dans le cas présent, la deuxième étape a été remplacée par un traitement avec le sulfate d'ammonium.

Le blanc d'oeuf d'oie dilué cinq fois avec de l'eau est amené à pH 4.5 avec de l'acide acétique à 30 %. On ajoute de l'Amberlite CG-50 tamponnée préalablement à pH 6.5 avec une solution tampon de phosphates 0.2 M: le lysozyme se trouve adsorbé sur la résine. Cette dernière est lavée avec de l'eau, puis avec une solution tampon (pH 6.5) 0.2 M. Le lysozyme est élué avec une solution tampon de phosphates (pH 6.5) 0.8 M (première étape: rendement 90 %).

Après dessalification par filtration sur Sephadex G-25 (éluant H_2O), on ajoute à la solution contenant le lysozyme du sulfate d'ammonium (40 % de saturation). Le lysozyme reste soluble, (deuxième étape: rendement 60–70 %). Cette solution est alors soumise aux 2 traitements habituels: filtration sur Sephadex G-25 avec l'eau comme éluant, (troisième étape) et chromatographie d'équilibre sur Amberlite CG-50 (quatrième étape: rendement 75 %).

RÉSULTATS

Teneur en lysozyme

1 kg de blanc d'oeuf d'oie contient 1.2 g (± 20 %) de lysozyme (quantité exprimée en lysozyme d'oeuf de poule). Le blanc d'oeuf de poule est 4 fois plus riche, lorsque l'on compare les quantités déterminées par un dosage d'activité.

Purification et comportement chromatographique

Tout au long de sa purification, le lysozyme de blanc d'oeuf d'oie est suivi par une substance inactive envers *M. lysodeikticus* qui a tendance à précipiter. Pendant la première étape de purification (voir MÉTHODES), au cours de la filtration sur Sephadex G-25 qui suit l'élution avec la solution tampon 0.8 M, la première moitié des tubes actifs est trouble. Avec le temps, une précipitation intervient, mais elle n'est pas complète. La séparation entre le précipité et le lysozyme n'a pas pu être réalisée au cours de la chromatographie sur CM-cellulose; cette étape a donc été remplacée par une précipitation avec le sulfate d'ammonium.

D'autre part, au fur et à mesure de la purification du lysozyme, l'enzyme devient de plus en plus labile. Les concentrations ne peuvent plus être effectuées par lyophilisation, mais seulement dans un dessiccateur.

La chromatographie d'équilibre a été réalisée en tamponnant l'Amberlite CG-50 à pH 7.40 avec une solution tampon de phosphates 0.2 M. Comme le montre la Fig. 1, cette étape est *absolument nécessaire*, car jusqu'à cette dernière chromatographie, le lysozyme reste accompagné de substances inactives envers *M. lysodeikticus*, comme le confirment également les électrophorèses sur Cello-gel. Le pic actif principal est précédé d'un petit pic représentant environ 5–10 % de l'activité totale mise en jeu. L'activité spécifique du pic principal ainsi que sa composition quantitative en acide aminés restent constantes d'une préparation à l'autre, mais varient fortement si la chromatographie d'équilibre est omise ou seulement remplacée par une filtration sur Sephadex G-75.

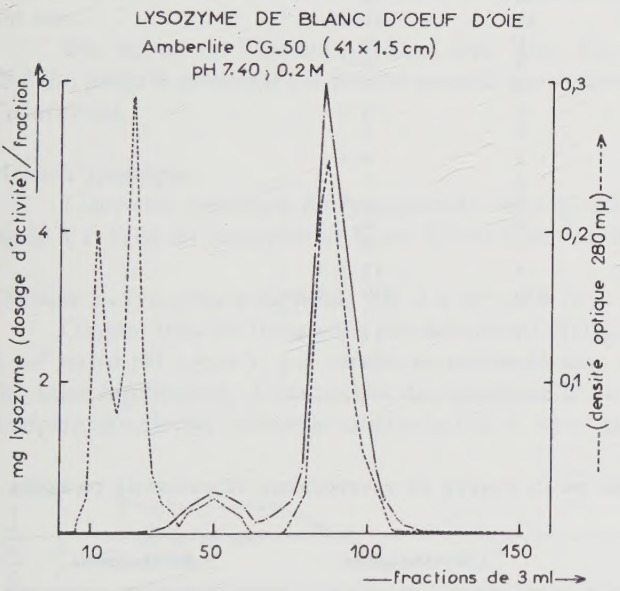

Fig. 1. Chromatographie d'équilibre du lysozyme de blanc d'oeuf d'oie.

Le comportement chromatographique du lysozyme provenant de blancs d'oeufs d'oies de Guinée est le même que celui du lysozyme des oeufs d'oies des Landes.

Composition quantitative en acides aminés

La composition quantitative en acides aminés du lysozyme de blanc d'oeuf d'oie est indiquée dans le Tableau I. Cette composition a été établie en tenant compte des résultats obtenus après différents temps d'hydrolyse. La faible teneur en cystine de ce lysozyme doit être soulignée ici. De plus, la détermination du tryptophane s'est révélée particulièrement difficile et délicate; seul l'emploi d'un grand nombre de méthodes (Tableau II) et la confrontation des résultats ainsi obtenus nous a permis d'indiquer une valeur probable de 2 résidus par molécule. Il est bon de rappeler ici que par la méthode de SPIES ET CHAMBERS nous avons pu établir sans difficulté les

teneurs des lysozymes de blanc d'oeuf de poule, de cane II et d'origine humaine, respectivement 6, 5–6 et 5 ± 1 résidus par molécule[1,2].

TABLEAU I

COMPOSITION QUANTITATIVE EN ACIDES AMINÉS DU LYSOZYME DE BLANC D'OEUF D'OIE

Comparaison avec les lysozymes de blanc d'oeuf de poule[1] et de cane II[3]. (Résidus/molécule.)

Acide aminé	*Lysozyme d'oie*	*Lysozyme de poule*	*Lysozyme de cane II*
Asp	16–17	21	19 ± 1
Thr	10–11	7	7
Ser	8	10	10–11
Glu	10–11	5	5
Pro	3	2	2
Gly	14–15	12	12
Ala	10 ± 1	12	11–12
Val	6–7	6	6
Cys	4	8	8
Met	2	2	2
Ile	7–8	6	5–6
Leu	5–6	8	8
Tyr	5–6	3	4–5
Phe	2	3	1
Trp	2	6	5–6
Lys	10	6	6
His	3	1	0
Arg	7 ± 1	11	13 ± 1
Total	129 ± 5	129	126 ± 5
Activité spécifique	6 ± 0.5	1	1 ± 0.2
Acide aminé C-terminal	Tyr	Leu	Leu

TABLEAU II

CARACTÉRISATION ET DÉTERMINATION DE LA TENEUR EN TRYPTOPHANE DU LYSOZYME DE BLANC D'OEUF D'OIE

Méthode	*Caractérisation*	*Résidus/mole*	
Chromatographie sur papier du lysozyme natif (réactif d'Ehrlich)	+		
SPIES ET CHAMBERS[4] (avec et sans traitement enzymatique)	Très faible coloration		1
Ozonisation (augmentation de l'absorption à 315 mμ)[5]	+	Environ	3
Hydrolyse alcaline[6] ($Ba(OH)_2$ 2 M, 64 h, 110°)	+	Environ	1
Action de la carboxypeptidase sur l'hydrolysat chymotrypsique du:			
lysozyme natif	+		0.55
lysozyme dénaturé	+	Environ	1*
Chromato-électrophorèse en couche mince de l'hydrolysat trypsique du lysozyme réduit (réactif d'Ehrlich)	2 peptides à fort rendement avec R_P et m différents	Probablement	2

* En même temps, libération de 5 résidus de Tyr (sur 5–6), de 3–4 résidus de Leu (sur 5–6), de 1–2 résidus de Phe (sur 2).

Poids moléculaire

Des essais de dialyse avec des tubes calibrés suivant la méthode de CRAIG, KING ET STRACHER[10] ont suggéré que le lysozyme de blanc d'oeuf d'oie doit avoir un poids moléculaire voisin de 15000. Ces données sont en accord avec les résultats analytiques (129 ± 5 résidus d'acides aminés/mole). De plus, le comportement des lysozymes de blanc d'oeuf de poule et d'oie sur Sephadex G-75 est le même: d'après WHITAKER[11] il est ainsi possible d'affirmer que leurs poids moléculaires sont du même ordre de grandeur.

Acides aminés terminaux

La carboxypeptidase B n'a libéré aucun acide aminé; par contre, grâce à des expériences effectuées avec la carboxypeptidase A, il a pu être établi que la tyrosine est l'acide aminé C-terminal du lysozyme d'oie. 0.4 résidu/mole est libéré après 2 h d'incubation en travaillant avec le lysozyme préalablement dénaturé par chauffage ou non.

Par action de l'aminopeptidase, Lys, Arg, Ala et Tyr sont très rapidement libérés; jusqu'à présent il n'a pas été possible par ce procédé d'identifier l'acide aminé N-terminal.

Activité spécifique

L'activité spécifique du lysozyme de blanc d'oeuf de poule étant par définition égale à 1, celle du lysozyme de blanc d'oeuf d'oie est de 6 ± 0.5.

Stabilité du lysozyme à différents pH et à 20° ou à 100°

Comme tous les lysozymes précédemment étudiés, le lysozyme d'oie est stable à 20° entre pH 4.5 et 7; par contre, en milieu alcalin, même à 20°, l'activité lysante diminue rapidement. L'instabilité du lysozyme d'oie est encore plus frappante à température élevée, comme le montre la Fig. 2. Alors que le lysozyme de blanc d'oeuf

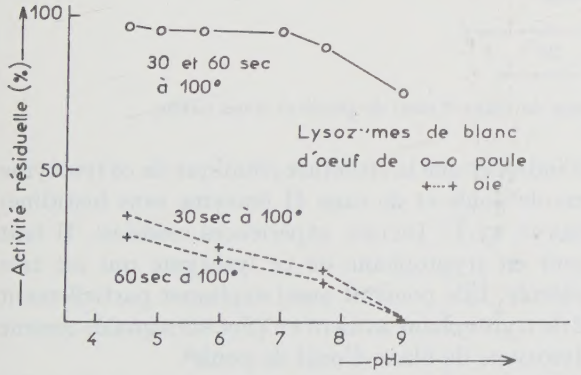

Fig. 2. Stabilité du lysozyme de blanc d'oeuf d'oie à différents pH et à 100°.

de poule peut être chauffé pendant 30 sec ou 1 min à 100° sans perte notable de l'activité entre pH 4.5 et 7, et avec une perte d'environ 25 % à des pH plus alcalins, le lysozyme d'oie perd d'emblée 50 % de son activité et, en milieu alcalin, est même complètement inactivé.

DISCUSSION ET CONCLUSION

Le lysozyme de blanc d'oeuf d'oie a un comportement chromatographique et une composition en acides aminés différents des autres lysozymes étudiés jusqu'à présent et notamment des lysozymes de blancs d'oeufs d'oiseaux. Les différences principales sont indiquées dans le Tableau I: la teneur en histidine est ici particulièrement élevée, la plupart des lysozymes ne possédant qu'un seul résidu de cet acide aminé par molécule. C'est sans doute à la faible teneur en cystine (2 résidus par molécule) qu'il faut attribuer l'instabilité du lysozyme d'oie; de précédentes recherches avaient, en effet, montré que les lysozymes de blanc d'oeuf de poule et de cane (4 résidus de cystine/molécule) et d'origine humaine (3 résidus de cystine/molécule) étaient beaucoup plus stables à 100° (réf. 8). Comme les ponts disulfures sont moins nombreux, on pouvait s'attendre à ce que la molécule, sans doute moins repliée, soit plus réactive; sa grande activité spécifique mais aussi la relative facilité avec laquelle le lysozyme d'oie natif est attaqué par les enzymes sont en faveur de cette interprétation. La Fig. 3 rappelle que le lysozyme de blanc d'oeuf de poule natif n'est pratiquement pas digéré par la trypsine; l'attaque du lysozyme d'oie natif se produit par contre avec plus de facilité.

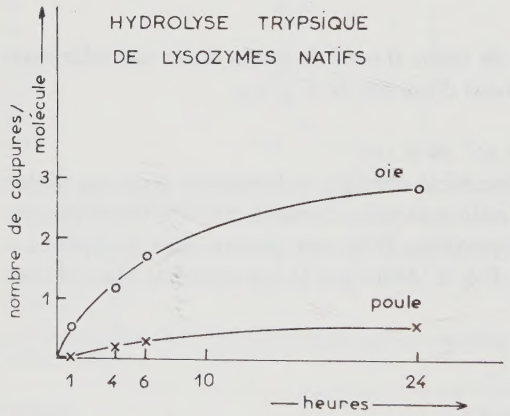

Fig. 3. Digestion trypsique des lysozymes de blanc d'oeuf de poule et d'oie natifs.

Dès à présent il est possible d'indiquer que la structure chimique de ce lysozyme est différente de celles du lysozyme de poule et de cane II (enzyme sans histidine) (J. JOLLÈS, J. HERMANN, B. NIEMANN ET P. JOLLÈS, expériences inédites). Il faut également souligner la faible teneur en tryptophane de ce lysozyme qui est très probablement de 2 résidus par molécule. Elle pourrait aussi expliquer partiellement sa grande labilité; plusieurs résidus de tryptophane avaient en effet été signalés comme impliqués dans le centre actif du lysozyme de blanc d'oeuf de poule[9].

RÉSUMÉ

Le lysozyme de blanc d'oeuf d'oie a été obtenu à l'état chromatographiquement pur; sa composition en acides aminés ainsi que ses acides aminés terminaux ont été déterminés. Ce nouveau lysozyme différent des autres lysozymes de blanc d'oeuf

d'oiseaux est pauvre en cystine et en tryptophane. Il est très labile, même en milieu acide, mais possède une activité spécifique supérieure à celle du lysozyme de poule et peut être attaqué à l'état natif par la trypsine.

REMERCIEMENTS

Les auteurs sont heureux de remercier Mr. G. MONACHON, Directeur du Domaine expérimental d'Artiguères, C.N.R.Z., Benquet (Landes) qui a bien voulu mettre à leur disposition les oeufs d'oie utilisés au cours de ces recherches. Ils remercient également Mlle J. POUJADE de sa collaboration technique (analyses d'acides aminés).

L'un d'entre nous (A.-C. D.) a bénéficié d'une aide généreuse de la maison F. Hoffmann-La Roche et Co., Bâle (Suisse).

Ce travail est basé sur une partie de la Thèse de Doctorat ès-Sciences (Faculté des Sciences, Paris) de A.-C. D.

BIBLIOGRAPHIE

1 P. JOLLÈS, *Angew. Chem. Intern. Ed.*, 3 (1964) 28.
2 P. JOLLÈS, D. CHARLEMAGNE, J.-F. PETIT, A.-C. MAIRE ET J. JOLLÈS, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 47 (1965) 2241.
3 J. JOLLÈS, G. SPOTORNO ET P. JOLLÈS, *Nature*, 208 (1965) 1204.
4 J. R. SPIES ET D. C. CHAMBERS, *Anal. Chem.*, 21 (1949) 1249.
5 A. PREVIERO, M. A. COLETTI-PREVIERO ET P. JOLLÈS, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 22 (1966) 17.
6 E. A. NOLTMANN, T. A. MAHOWALD ET S. A. KULY, *J. Biol. Chem.*, 237 (1962) 1146.
7 H. UHLIG, K. LEHMANN, S. SALMON, J. JOLLÈS ET P. JOLLÈS, *Biochem. Z.*, 342 (1965) 553.
8 J. JOLLÈS, A.-C. DIANOUX, J. HERMANN, B. NIEMANN ET P. JOLLÈS, *Biochim. Biophys. Acta*, 128 (1966) 568.
9 L. N. JOHNSON ET D. C. PHILLIPS, *Nature*, 206 (1965) 761.
10 L. C. CRAIG, T. P. KING ET A. STRACHER, *J. Am. Chem. Soc.*, 79 (1957) 3729.
11 J. R. WHITAKER, *Anal. Chem.*, 35 (1963) 1950.